

О Т З Ы В

официального оппонента на диссертационную работу БУРАКОВА Антона Владимировича на тему «ЦИТОСКЕЛЕТ КАК СИСТЕМА ПУТЕЙ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ТРАНСПОРТА В КЛЕТКАХ ЖИВОТНЫХ», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.04 – «клеточная биология, цитология, гистология»

Актуальность темы исследования

Жизнеспособность и жизнедеятельность живых клеток поддерживается с помощью внутриклеточного транспорта необходимых соединений и органелл. Среди процессов которые обеспечиваются этой системой следует отметить эндо- и экзоцитоз, поляризацию клетки в ответ на воздействие внешних сигналов, направленное движение, рост клеточных отростков, особенно у нервных клеток и ряд других. Транспорт в цитоплазме осуществляется специальной системой, перемещающей органеллы вдоль элементов цитоскелета. Известно, что цитоскелет клеток животных представлен микрофиламентами, промежуточными филаментами и микротрубочками. При этом достаточно длинные промежуточные филаменты обеспечивают жёсткость клетки и ее размеры, помогают удерживать митохондрии в определённых клеточных компартментах, но не участвуют в процессах внутриклеточного транспорта. Перемещение органелл осуществляется вдоль микротрубочек и микрофиламентов посредством специальных моторных белков, относящихся к семействам кинезинов, динеинов и миозинов. Моторные белки – это молекулы, использующие химическую энергию гидролиза АТФ для осуществления своих конформационных изменений, что приводит к последовательным «шагам» такой молекулы по микротрубочкам или микрофиламентам. Каждый моторный белок движется в одном строго заданном направлении. Поэтому наличие на поверхности органеллы одновременно различных моторных белков, а также выборочная активация нужных моторов позволяет осуществлять направленный транспорт по цитоплазме. Благодаря исключительной важности процессов внутриклеточного транспорта для жизнедеятельности клеток, исследования в этой области были особенно интенсивными в последние два десятилетия, благодаря бурному развитию современных методов исследований. Однако ряд фундаментальных вопросов об организации внутриклеточного транспорта оставался без ответа, не давая возможности объединить все известные факты в одну непротиворечивую схему.

Поэтому диссертационная работа Буракова А.В., посвященная исследованию организации и функционированию цитоскелета в клетках млекопитающих, **является важной и актуальной.**

Научная новизна исследований и полученных результатов

Настоящая работа представляет собой оригинальное экспериментальное исследование, в котором было впервые показано, что расположение centrosомы в эукариотической клетке регулируется через взаимодействие трех сил, приложенных к микротрубочкам и генерируемых цитоплазматическим динеином, актомиозиновой системой и динамичными плюс-концами микротрубочек. При этом динамика плюс-концов микротрубочек дестабилизирует положение centrosомы, а динеиновые и актомиозиновые силы центрируют её. При этом основной центрирующей силой является сила динеина, приложенная вдоль микротрубочек пропорционально их длине, а актомиозиновые силы являются более слабыми и сами по себе недостаточны для центрирования данной органеллы. Установлено, что радиальность системы интерфазных микротрубочек зависит от активности динеина и протеинкиназы LOSK, которые участвуют в заякоривании микротрубочек на centrosоме, при этом сам динеин удерживает микротрубочки на centrosоме. Показано, что активность протеинкиназы LOSK необходима для поддержания уровня centrosомного динактина, а ее ингибирование приводит также к нарушениям клеточной адгезии, динамики фокальных контактов, поляризации и локомоции клетки. Установлено, что механизм миозин-зависимого транспорта исключает возможность перемещения «грузов» в клетке к минус-концам микрофиламентов, при этом, именно динамичность микрофиламентов является фактором, определяющим однонаправленность внутриклеточного транспорта по актиновой транспортной сети. Полученные экспериментальные данные и разработанная компьютерная модель впервые позволили объяснить центральное расположение centrosомы в клетках животных и описать все аспекты ее центрирования.

Достоверность результатов и обоснованность выводов

Достоверность полученных в этой работе результатов в первую очередь обусловлена адекватным использованием современных биохимических, молекулярно-биологических методов, методов клеточной биологии и не вызывает сомнений. Необходимо отметить методичность и тщательность в выполнении работы. Во всех разделах работы было использовано достаточное количество экспериментальных точек и повторов. Автором использованы надежные методы статистической обработки результатов. Для анализа динамических изменений в цитоскелете клетки использованы современные методы микровидеосъемки. Грамотный и критический

анализ полученного автором экспериментального материала, произведенный с привлечением данных других исследователей позволяет с уверенностью свидетельствовать о обоснованности сделанных в работе выводов и рекомендаций. Достоверность результатов и обоснованность выводов подтверждается также представлением и обсуждением полученных результатов на многочисленных Российских и международных конференциях, а также публикациями в ведущих Российских и международных журналах.

Практическая значимость полученных результатов

Полученные результаты существенно расширяют представления о функционировании транспортных систем в животной клетке. Понимание пространственной организации внутриклеточного транспорта даёт возможность подробнее исследовать многие процессы, чрезвычайно интересные как с точки зрения фундаментальной цитологии, так и с биомедицинской точки зрения. В частности, способы перемещения в цитоплазме клеток различного рода патогенов могут определять инфекционность того или иного возбудителя заболеваний. Разработка фармакологических агентов, влияющих на внутриклеточный транспорт патогенных частиц, является одной из задач современной молекулярной медицины. Разработка стимуляторов или ингибиторов процесса поляризации клетки также является перспективным направлением современной прикладной биологии. Таким образом, полученные в данной работе результаты имеют не только фундаментальное, но и существенное научно-практическое значение для современной клеточной биологии. Полученные результаты могут быть использованы в исследованиях, проводимых в НИИ Российской академии наук, Российской Академии медицинских наук, в вузах РФ с медицинской специализацией, а также в курсах лекций по клеточной и молекулярной биологии.

Содержание работы

Диссертационная работа Буракова Антона Владимировича изложена на 232 страницах машинописного текста и состоит из: Введения, Обзора литературы, Экспериментальной части, включающей описание Материалов и Методов исследования, Результатов и Обсуждения в трёх частях, Выводов, Заключения, Списка видеоматериалов, Списка публикаций по теме диссертации и Списка литературы. Работа иллюстрирована 63 рисунками и 4 таблицами. Библиография включает 435 публикаций (из них 9 в Российских журналах).

Название работы, вынесенное на титульную страницу, в целом отражает содержание диссертации.

Во "**Введении**" Бураков А.В. кратко изложил историю вопроса и актуальность работы. В этом разделе также сформулированы цели и задачи исследования, положения, выносимые на защиту, научная новизна и практическая ценность работы и представлена апробация результатов.

Обзор литературы занимает 34 страниц и содержит несколько подразделов.

Большая часть обзора посвящена рассмотрению устройства и функционированию транспортной системы микротрубочек. В данной части автор приводит современные данные относительно устройства микротрубочек и centrosom, рассматривает их динамические свойства. Затем переходит к описанию и анализу данных относительно устройства и функционирования транспортной системы, ассоциированной с микротрубочками, обращает особое внимание на так называемые моторные белки: кинезины и динеины. Рассмотрены вопросы связанные с двунаправленностью транспорта по тубулиновым микротрубочкам. В конце обзора литературы автор разбирает систему микрофиламентов животной клетки и транспортные процессы, которые она осуществляет.

В целом обзор литературы свидетельствует о глубоком знании автора работы современных данных относительно свойств и функционирования цитоскелета в животных клетках.

В главе **«методы исследования»** представлены современные методы клеточной биологии, биохимии и молекулярной биологии.

Следует особо отметить, что автором были использованы культуры клеток разного происхождения и от разных видов живых организмов. Широкое применение в работе нашли и разнообразные микроскопические подходы (включая световую и электронную микроскопию), включая видеомикроскопию, для исследования динамических изменений в компонентах цитоскелета.

Все методы описаны достаточно подробно и полностью подходят для решения сформулированных в диссертации задач.

Глава, посвященная **результатам и их обсуждению** состоит из трех частей.

Часть 1. Изучение механизмов позиционирования centrosom в интерфазных клетках млекопитающих.

В первой части своей работы автор, с использованием самых современных методов клеточной и молекулярной биологии, исследовал вовлечение ряда клеточных белковых структур в формирование расположения centrosom в интерфазных клетках. В результате ряда изящных экспериментов (с использованием микроинъекций и специфических ингибиторов) автор продемонстрировал, что

расположение centrosомы в эукариотической клетке регулируется через взаимодействие нескольких сил, приложенных к микротрубочкам и генерируемых цитоплазматическим динеином, актомиозиновой системой и динамичными плюс-концами микротрубочек. На основании полученных результатов, а также с привлечением данных других исследователей, автором была построена непротиворечивая компьютерная модель, которая объясняет центральное расположение centrosомы в интерфазных клетках животных и описывает ряд аспектов, связанных с ее центрированием.

Часть 2. Изучение роли протеинкиназы LOSK и динеина в формировании радиальной системы микротрубочек.

В следующей части работы автор исследовал роль отдельных белковых компонентов centrosомы (протеинкиназы LOSK, динактина) и динеина, участвующего в транспорте везикул в формировании радиальной системы микротрубочек. К безусловной заслуге настоящей работы следует отнести проведение экспериментов как в системе *in vivo*, так и *in vitro*, а также на нескольких типах клеток (Vero, Hela, CHO, CV-1). Для решения поставленной задачи автором были сконструированы и использованы различные генетические конструкции для экспрессии нескольких форм протеинкиназы LOSK и для нарушения динеин-динактинового комплекса. В результате проведенных экспериментов было продемонстрировано, что серин-треониновая протеинкиназа LOSK принимает участие в заякоривании микротрубочек на centrosоме, и что ингибирование её активности приводит к истощению пула centrosомного динактина и к утрате радиальности тубулиновой транспортной системы клетки. Кроме того исследования привели к открытию того факта, что моторный белок динеин (осуществляет транспорт в направлении минус-конца микротрубочек) играет структурно-образующую роль в организации тубулиновой транспортной сети, и его функция связана с удержанием микротрубочек на centrosоме. Таким образом, наряду с протеинкиназой LOSK, от активности которой зависит количество centrosомного динактина, динеин также можно внести в список белков, отвечающих за процессы заякоривания.

Часть 3. Изучение механизмов миозин-зависимого транспорта мембранных органелл по актиновым микрофиламентам.

В последней части работы автор исследовал механизмы транспорта по актиновым микрофиламентам. Данная система транспорта в отличие от тубулиновой использует для транспорта органелл и везикул молекулы миозина. Кроме того актиновая транспортная система характеризуется отсутствием геометрически правильной организации и однонаправленностью транспорта.

Заключение

Диссертационная работа Буракова Антона Владимировича на тему «ЦИТОСКЕЛЕТ КАК СИСТЕМА ПУТЕЙ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ТРАНСПОРТА В КЛЕТКАХ ЖИВОТНЫХ», является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как фундаментальные научные достижения в области молекулярной и клеточной биологии, что полностью соответствует п.9 Положения о порядке присуждения учёных степеней, утверждённого постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, а диссертант заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Заведующий Лабораторией
молекулярной генетики соматических клеток
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института молекулярной генетики Российской академии наук,
доктор биологических наук, профессор



И.А. Гривенников

Подпись И.А. Гривенникова заверяю,
Ученый секретарь
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института молекулярной генетики Российской академии наук,
кандидат биологических наук



Л.Е. Андреева

« 25 » апреля 2014 г., г. Москва

Отзыв официального оппонента

на диссертационную работу БУРАКОВА Антона Владимировича
«ЦИТОСКЕЛЕТ КАК СИСТЕМА ПУТЕЙ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ТРАНСПОРТА В
КЛЕТКАХ ЖИВОТНЫХ»,

представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по
специальности 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология.

Важнейшее значение для выполнения клеточных функций имеет так называемая компартментализация клетки – т.е. сложная система ее организации, когда каждый отдел клетки выполняет определенные функции и его расположение привязано к определенной локализации. Для обеспечения жизненно важных процессов – деления клетки, ее локомоции, взаимодействия клеток друг с другом, формирования тканей и органов необходима строгая координация функционирования всех отделов клетки. В клетках многоклеточных организмов, в частности в клетках животных, сформировалась сложная транспортная система, позволяющая быстро перемещать органеллы к месту их функционирования. В ходе эволюции появились многочисленные моторные белки и белковые комплексы, которые доставляют нужные органеллы в нужный момент и в нужное место. Эти моторные белки могут доставлять свой груз, передвигаясь по специализированным путям и направляющим. Роль таких направляющих играет цитоскелет. Понимание механизмов, лежащих в основе внутриклеточного транспорта, представляется чрезвычайно важным, потому что от того, насколько скоординированно и успешно осуществляются внутриклеточный транспорт, зависят процессы роста и функционирования нейронов, миграции клеток в организме, а следовательно заживление ран, развитие воспалительных и иммунных реакций, формирование органов в эмбриогенезе, выделение экзосом, и многие другие жизненно важные процессы. Следовательно, для регуляции и возможной корректировки этих процессов при патологиях, надо очень хорошо понимать молекулярные события, управляющие этими процессами. За последнее время исследованию этих вопросов было посвящено много работ. Были расшифрованы структуры моторных белков, описан механизм их перемещения по цитоскелету. Однако ряд фундаментальных вопросов об организации внутриклеточного транспорта оставался без ответа и, поэтому, объединение всех известных фактов не представлялось возможным.

Целью данной работы было исследование молекулярных механизмов, определяющих архитектуру системы микротрубочек, как основной транспортной системы клетки и выявление факторов, регулирующих транспорт мембранных органелл по другой транспортной системе - сети актиновых микрофиламентов.

Для выполнения этих целей были сформулированы следующие **задачи**:

1. Изучить *in vivo* силы, участвующие в центрировании centrosомы, выяснить их молекулярную природу и механизмы регуляции. Построить рабочую модель позиционирования centrosомы;
2. Исследовать *in vivo* и *in vitro* роль динеина, как функционально-активного компонента centrosомы. Изучить работу этого минус-концевого моторного белка в качестве структурно-образующего элемента цитоскелета, обеспечивающего удержание микротрубочек на centrosоме.
3. Изучить *in vivo* и *in vitro* роль серин-треониновой протеинкиназы LOSK в процессах организации микротрубочек вокруг centrosомы. Исследовать работу этого белка как одного из участников процесса заякоривания микротрубочек на centrosоме.
4. Детально изучить механизмы миозин-зависимого транспорта органелл по сети актиновых филаментов *in vivo* и *in vitro*. Установить, какую роль в этом процессе играет динамика микрофиламентов и какие фундаментальные свойства актомиозиновой транспортной системы она обуславливает.

Работа состоит из трех основных частей. В первой части работы описан саморегулирующийся механизм позиционирования centrosомы в интерфазных клетках животных. Centrosома — ключевая структура в регуляторных процессах, и нарушение ее функций приводит к аномалиям клеточного цикла, дефектам в развитии живых тканей и организмов, к возникновению трофических и онкологических заболеваний. Вопрос позиционирования centrosомы, как организующего центра роста микротрубочек представляется очень интересным. Автор анализирует все силы, участвующие в центрировании centrosомы, показаны роли сил, продуцируемых динеином, актомиозиновой системой и динамическими плюс-концами микротрубочек, определен относительный вклад

каждой из этих сил в процесс позиционирования центросомы в геометрическом центре клеток. Важным является установленный факт, что регуляторами этого процесса выступают белки семейства малых ГТФаз – RhoA и Cdc42. Очень интересны результаты о роли актинового кортекса и взаимодействия его с плюс-концами микротрубочек в определении архитектуры системы микротрубочек. Известны данные о нарушении актинового кортекса при определенных патологиях, например при опухолевой трансформации. Мне представляется интересным исследовать зависимость организации системы микротрубочек от целостности актинового кортекса в разных клеточных системах.

Вторая часть также посвящена исследованию факторов, определяющих функционирование радиальной транспортной сети микротрубочек в клетке. Недавно было показано, что нуклеация микротрубочек и их заякоревание на центросоме и удержание их минус-концов – это две отдельные активности центросомы. И если процесс нуклеации был довольно хорошо изучен, то функция заякоревания остается до конца не изученной. В представленной работе впервые было продемонстрировано участие в процессе удержания микротрубочек на центросоме двух абсолютно разных белков – динеина и протеинкиназы LOSK. Динеин до этого был описан как минус-концевой моторный белок, перемещающий грузы по микротрубочкам. Его роль в качестве структурно-образующего элемента цитоскелета показана впервые. Для серин-треониновой протеинкиназы LOSK это также новая функция, открытая в процессе выполнения данной работы. Открытие двух новых участников процесса заякоревания микротрубочек на центросоме и описание механизма ее позиционирования существенно углубляют имеющиеся представления об архитектуре и функционировании тубулиновой транспортной сети.

В заключительной третьей части работы были изучены молекулярные механизмы транспорта по актиновым филаментам, позволяющие выяснить еще один важный аспект внутриклеточного транспорта, остававшийся неясным в течение длительного времени. В результате было показано, что транспорт мембранных частиц по актиновым филаментам зависит от динамики микрофиламентов. Интересным является факт, что несмотря на наличие в клетке моторного белка миозина VI, способного к минус-концевому транспорту по актиновым филаментам в системах *in vitro*, в клетке минус-концевой актин-зависимый транспорт описан не был. Высказано остроумное предположение, что

этот факт объясняется быстрой разборкой актиновых филаментов, препятствующей продвижению частиц к минус-концу филаментов. В этой связи хотелось бы немного подробнее услышать о функционировании миозина VI *in vivo*, например есть ли данные о функционировании клеток с пониженной активностью миозина VI. Факт существования такого минус-концевого мотора и его присутствия на мембранных частицах представляется удивительным в том случае, если этот моторный белок не выполняет определенных функций в клетке.

Работа написана по стандартному образцу, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов. Результаты разбиты на три отдельные части и совмещены с обсуждением, что представляется мне оправданным, так как облегчает восприятие материала. Обзор литературы подробный и хороший, снабжен самыми необходимыми рисунками. Материалы и методы описаны аккуратно, достаточно подробно. Хочется отметить, что набор используемых методов и подходов достаточно широк. Использованы и классические методы, и очень современные: трансфекция клеток плазмидами, несущими ДНК окрашенных белков цитоскелета; РНК интерференция; клонирование с помощью ПЦР и последующая экспрессия рекомбинантных белков; а также современные методы микроскопии, такие, как прижизненная видеомикроскопия, методы исследования динамики актиновой сети с помощью оценки восстановления свечения после выжигания лазером (FRAP) и т.д. Для анализа изображения использованы компьютерные программы, кроме того были разработаны программы для компьютерного моделирования, использованные для оценки и проверки предлагаемых механизмов, регулирующих подвижность centrosom. Отдельно надо отметить приложение к диссертации диска с видео очень хорошего качества. В работе 7 выводов, они хорошо сформулированы, обоснованы и полностью отражают полученные результаты.

При чтении работы возникают отдельные вопросы:

1. Не очень ясное описание рисунка 13. В частности не поняла, что означает прозрачный столбец.
2. При рассматривании роли актинового тока при определении места centrosомы в клетке (параграф 20, стр 125) сила актинового тока рассматривается, как производное расстояния до края клетки. Это не совсем верно, так как а) ретроградный актиновый ток на краю клетки в

ламеллиподии и в центральной части определяется разными механизмами и поэтому характеризуется разной скоростью и силой и б) актиновый ток, как правило, зависит от ориентации пучков микрофиламентов и в центральной части клетки направлен вдоль них, поэтому практически может быть просто не выражен вдоль короткой оси клетки

3. Положения, выносимые на защиту очень длинные и поэтому сложно воспринимаются.

Эти вопросы и замечания носят дискуссионный характер и не умаляют достоинств диссертации.

По результатам исследования опубликовано 14 статей в рецензируемых высокорейтинговых отечественных и зарубежных журналах и 1 статья в специализированном сборнике, 33 тезиса докладов на Российских и международных конференциях. 9 статей индексируется по Web of Science.

Диссертация оформлена в соответствии с действующими правилами ВАК, компьютерная печать четкая, текст хорошо выверен. Представленные рисунки и схемы четкие, хорошего качества, хорошо иллюстрируют полученные результаты. Автореферат соответствует содержанию диссертации и отражает содержание публикаций автора. Хочется отдельно отметить очень высокое качество рисунков в автореферате.

Полученные данные имеют большое теоретическое значение, поскольку впервые была описана совокупность механизмов позиционирования centrosомы в интерфазных клетках животных, выявлена новая роль белков, участвующих в образовании радиальной транспортной системы микротрубочек, смоделирован общий механизм, описывающий процессы центрирования микротрубочек. Работа имеет также практическое значение с точки зрения развития новых подходов в производстве агентов, влияющих на эффективность внутриклеточного транспорта различных патогенных частиц, или при воздействии на подвижность клеток, участвующих в развитии воспаления, иммунных реакциях или при опухолевом метастазировании.

Таким образом, диссертационная работа А.В. Буракова является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных исследований разработаны теоретические положения, выявляющие новые молекулярные механизмы, регулирующие внутриклеточный транспорт, совокупность которых можно квалифицировать как научные достижения в области клеточной биологии, что полностью соответствует п.9 Положения о порядке присуждения учёных степеней, утверждённого постановлением правительства РФ от 24 сентября 2013г. № 842, а диссертант заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

29 апреля 2014 года

Ведущий научный сотрудник,
доктор биологических наук



А.Ю. Александрова

115478, г. Москва, Каширское шоссе, 24,
ФГБУ «РОНЦ им.Н.Н. Блохина» РАМН,
Тел. +7(499) 3235311
e-mail: tonya_alex@yahoo.com

Подпись А.Ю. Александровой заверяю
Ученый секретарь ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН
кандидат медицинских наук



Кубасова И.Ю.

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу А.В. Буракова «Цитоскелет как система путей внутриклеточного транспорта в клетках животных», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

С развитием методов анализа внутриклеточных процессов, в частности, методов иммуномикроскопии и высокоразрешающей и скоростной цейтраферной видеосъемки стало очевидно, что цитоскелет выполняет не только опорно-двигательную функцию в клетке, но и формирует разветвленную систему внутриклеточного транспорта, необходимую для перемещения органелл и надмолекулярных структур в различные компартменты клетки. Считается, что из трех основных типов внутриклеточных фибрилл: микротрубочек, микрофиламентов и промежуточных филаментов, лишь первые два типа фибрилл участвуют в формировании транспортной системы, в то время как промежуточные филаменты выполняют в клетке структурную роль. Микротрубочки и микрофиламенты, хотя и состоят из различных белков, имеют важное сходство друг с другом. Оба типа фибрилл существуют как динамические образования, т.е. на их концах постоянно идет прикрепление или диссоциация мономеров. При определенных условиях, которые реализуются в клетках, на одном из концов микротрубочек и микрофиламентов (плюс-конец) мономеры в основном прикрепляются, а с минус-конца – диссоциируют. В результате возникает т.н. тредмиллинг мономеров внутри микрофиламентов и микротрубочек – протомер, присоединившийся на одном конце фибриллы через некоторое время оказывается на другом ее конце и диссоциирует от него.

Описаны белки, способные модулировать процессы прикрепления / диссоциации протомеров к микротрубочкам и микрофиламентам. Эти белки могут изменять кинетику взаимодействия мономеров с полимерами актина и тубулина и, таким образом, варьировать длину и устойчивость динамических фибриллярных структур. Описано большое число молекулярных моторов, которые движутся по микротрубочкам и микрофиламентам и перемещают вдоль них различные грузы, причем сегодня известны как плюс-концевые, так и минус-концевые моторы. Столь сложное устройство внутриклеточной транспортной системы свидетельствует о той важной роли, которая ей отводится в поддержании жизнеобеспечения клетки и выполнении ею специфических функций, например, транспорту компонентов синапса от синтетического аппарата нейрона к самому синапсу, который может находиться на расстоянии метра от ядра этой клетки.

В то же время следует отметить, что многие вопросы устройства транспортной системы клетки остаются малоизученными. Одним из таких вопросов является механизм поддержания центральной позиции центросомы в клетках и радиальной ориентации микротрубочек, который позволяет задавать основным транспортным путям направление «центр-периферия» и минимизировать расстояние и время доставки грузов. Остается недостаточно изученным вопрос молекулярного строения центросомы. В ее состав входит более 300 белков, и роль большинства из них не определена. Наконец, несмотря на активные исследования в этой области, многое еще непонятно во взаимодействии тубулиновой и актиновой транспортных субсистем, в закономерностях транспорта по микрофиламентам.

В связи с вышесказанным актуальность рецензируемой работы, несомненно, высока; получение новых фундаментальных знаний в этой области позволит существенно углубить понимание биологии клетки. Дополнительно, это исследование может дать важную информацию для проведения прикладных работ в области клеточных технологий, будь то работа со стволовыми клетками для нужд регенеративной медицины, проекты, направленные на дифференцировку малигнизирующихся клеток в онкологии, восстановление нервных волокон после травмы и др. Во всех этих процессах обязательно задействована внутриклеточная транспортная система.

В работе были поставлены две основные цели:

1. Исследовать молекулярные механизмы, определяющие архитектуру основной транспортной системы клеток – сети микротрубочек.
2. Установить фактор, определяющий направленность транспорта мембранных органелл по другой транспортной системе – сети микрофиламентов.

Для достижения этих целей автор решал следующие конкретные задачи.

1. Изучить силы, помещающие центросому в геометрический центр клетки, выяснить молекулярную природу этого процесса и его регуляцию. Построить математическую модель, описывающую саморегулирующийся процесс центрирования центросомы в клетке.
2. Изучить роль молекулярного мотора динеина и протеинкиназы LOSK в процессах организации микротрубочек вокруг центросомы.

3. Изучить роль динамики актиновых филаментов в поддержании миозин-зависимого транспорта в клетках.

При выполнении работы автор применил широкий арсенал современных научных технологий, среди которых, методы клеточной биологии, различные виды микроскопии, в том числе, световая флуоресцентная микроскопия высокого разрешения, скоростная цейтраферная съемка, метод FRAP, электронная микроскопия, липофекция и микроинъекции в клетки, количественный компьютерный анализ цифровых изображений, математическое моделирование, методы молекулярной биологии, биохимии белков и иммунохимии. Автор разработал оригинальную модель локальной разборки микротрубочек в живой клетке в сочетании с видеомикроскопией микротрубочек и других внутриклеточных объектов. Он применил в работе систему изучения подвижности *in vitro*. Используемые методические подходы адекватны поставленным задачам. Они позволили получить большое количество важных научных результатов.

К основным достижениям автора следует отнести следующие.

1. Описана совокупность сил и воздействий, реализующих позиционирование центросомы в геометрическом центре клетки. К основным силам, выполняющим эту функцию, относятся моторная активность минус-концевого молекулярного мотора динеина, активность актомиозиновой системы в виде ретроградного тока актина и толкающее усилие, возникающее при полимеризации периферических концов микротрубочек, заякоренных на центросоме. Введение этих параметров в математическую модель позиционирования центросомы в клетке позволило воспроизвести в рамках модели все известные перемещения центросомы в клетке при различных воздействиях на нее, включая те, которые получил сам автор, и те, которые известны из литературы. Создание модели позиционирования центросомы позволило автору провести ряд компьютерных симуляций - изменять соотношение основных сил позиционирования, и предсказать поведение центросомы при таких воздействиях, которые зачастую трудно или невозможно воспроизвести экспериментально. В этом большое преимущество математического моделирования, хотя следует оговориться, что соответствие модели экспериментальным данным еще не означает, что реальная система работает именно так, как определяет модель. В биологической системе всегда есть вероятность неучтенных факторов, которые могут оказывать воздействие на центросому с таким же конечным результатом. Однако, в любом случае, прогресс, достигнутый автором в понимании

позиционирования центросомы в клетке, имеет огромное значение для понимания устройства основного модуля системы внутриклеточного транспорта – сети микротрубочек, которые во многих клетках отходят от центросомы в виде звезды в направлении плазматической мембраны.

2. Автор провел большую работу по характеристике двух белков - участников формирования радиальной системы микротрубочек, отходящих от центросомы. В сферу его внимания попал молекулярный мотор динеин и протеинкиназа LOSK (последняя была открыта в лаборатории д.б.н., проф. Е.С. Надеждиной, где автор выполнял большую часть своей работы). Диссертант продемонстрировал, что моторная активность динеина играет определяющую роль в формировании радиальной системы микротрубочек. Впервые было показано, что этот белок важен для удержания новообразованных на центросоме микротрубочек. Согласно предложенной автором схемы, динеин может возвращать открепившиеся от центросомы микротрубочки обратно, используя в качестве направляющей прикрепленную к центросоме микротрубочку. Протеинкиназа LOSK за счет своей активности поддерживает требуемый уровень центросомного динактина – белкового комплекса, входящего в состав активного динеина. При инактивации динеина и LOSK происходит хаотизация микротрубочек, хотя нуклеирующая активность центросомы сохраняется. В совокупности, эти результаты позволили впервые продемонстрировать участие динеина, более известного в роли мотора-перевозчика грузов по микротрубочкам, в качестве структурно-образующего элемента цитоскелета. Аналогично, новые данные об участии протеинкиназы LOSK в этом процессе позволили углубить понимание ее роли в организации системы внутриклеточного транспорта, а также клеточной подвижности в целом.

3. С помощью специфических ингибиторов диссертант показал важную роль динамики актина в реализации миозин-зависимого внутриклеточного транспорта. В самом деле, для плюс-концевого транспорта по микрофиламентам необходима постоянная надстройка актинового филамента для продолжения перемещения груза с помощью молекул миозинов. В специальных экспериментах с использованием электронной стереомикроскопии клеток автор продемонстрировал, что для успешного «перескока» миозинового мотора с грузом с одного микрофиламента на другой для продолжения движения критическим условием является постоянное удлинение того филамента, по которому движется груз. На основании динамических свойств микрофиламентов автор заключает, что однонаправленный транспорт по актину к его плюс-концу определяется не

типом молекулярного мотора (в клетке есть и минус-концевые миозины), а именно разборкой микрофиламентов с минус-конца, что исключает движение в этом направлении, несмотря на присутствие в клетках соответствующих моторов. Последнее утверждение дискуссионно (см. ниже).

Критических замечаний по существу работы не много. Основные из них следующие.

1. Смушает высокая концентрация ингибитора КЛЦМ ML-7 (с. 55). Автор использовал 50 микроМ ML-7 для подавления активности КЛЦМ в клетках, хотя стандартная, по литературе, концентрация для этой цели 10 микроМ. При более высокой концентрации начинает проявляться неспецифическое действие ML-7 на протеинкиназы А и С, а также на ионные каналы плазматической мембраны. Поэтому говорить о том, что при использовании ML-7 специфически подавили активацию миозина под действием КЛЦМ не совсем корректно, при такой концентрации могут проявиться прейотропные эффекты ингибитора. При этом активность КЛЦМ, конечно же, будет подавлена.

2. Единственное существенное возражение и желание подискутировать вызывает тезис автора о том, что динамика микрофиламентов исключает возможность минус-концевого транспорта по ним, несмотря на наличие в клетках минус-концевого молекулярного мотора миозина VI. Автор исходит из того, что движение груза в сторону разбирающегося минус-конца актинового филамента не может быть продолжительным. Возможно, в некоторых случаях в клетке достаточны и короткие перемещения, осуществляемые миозином VI. Также не стоит забывать о том, что во многих, если не во всех клетках экспрессируется тропомодулин, белок кеппирующий и стабилизирующий минус-концы микрофиламентов. В присутствии тропомодулина диссоциация актиновых мономеров с минус-конца ингибируется и миозин VI-зависимый минус-концевой транспорт может осуществляться и на большие расстояния. Более того, при кеппировании плюс-конца микрофиламентов, например, белком CapZ и одновременном снятии тропомодулинового блока с минус-конца может происходить значительное удлинение микрофиламента на минус-конце, что опять же позволит реализовать минус-концевой транспорт.

В подтверждение своего тезиса о невозможности такого типа перемещения по микрофиламентам в клетке автор приводит данные о том, что транспорт вдоль микрофиламентов к их минус-концу не наблюдали. Однако, это не означает, что он принципиально не возможен, как в итоге утверждает автор. Наблюдать (и доказать)

двунаправленный транспорт по актину в клетках может быть довольно сложно, учитывая существенно менее упорядоченную организацию микрофиламентов, чем микротрубочек и возможность формирования пучков из разнонаправленных микрофиламентов. Таким образом, не отрицая вывода автора о том, что сама динамичность микрофиламентов препятствует минус-концевому транспорту вдоль них, я считаю более корректным ограничить это утверждение случаем микрофиламентов со свободными минус-концами до тех пор, пока автором или кем-нибудь другим не будут получены убедительные данные о принципиальной невозможности минус-концевого транспорта по микрофиламентам в любых условиях.

Диссертационная работа написана по традиционному плану и состоит из Введения, Обзора литературы, экспериментальной части, включающей описание Материалов и Методов исследования, Результатов и Обсуждения в трех частях, Выводов и Заключения. В работе также имеется Список видеороликов, Список публикаций автора и Список литературы (435 источников). Объем работы 232 с. Работа иллюстрирована 63 рисунками и 4 таблицами. Структура диссертации позволяет без труда следовать за логикой автора. Этому же способствуют и компактно написанные главы собственных исследований, каждая из которых заканчивается промежуточным выводом.

Вместе с тем, в работе имеются недочеты оформительского характера, затрудняющие восприятие материала. Так, в тексте встречается довольно много опечаток (например, на сс. 15, 17, 43-46, 55 и др.), практикуется использование англицизмов и языковых смешений при наличии русскоязычных эквивалентов (эквистрирование, с. 63; down- up- регуляция, конструкт, с. 135 и др.). На рис. 42Б не показана черная стрелка, упомянутая в подписи к рисунку. На с. 31 дано цитирование цифрами (98), хотя в работе принято цитирование (Фамилия автора + год). Ссылка Smurova et al., 2002 отсутствует в списке литературы, хотя есть ссылка Смурова и др. 2002. Вероятно, это одна и та же работа. Сделанные замечания не являются принципиальными и не снижают общей высокой оценки рецензируемой работы.

В целом, диссертационная работа А.В. Буракова представляет собой завершенное исследование фундаментального характера, в котором на высоком методическом уровне систематически изучены закономерности организации цитоскелетных структур, как системы транспорта органелл и макромолекулярных комплексов в клетках животных. Своими исследованиями автор сформировал новое направление в отечественной биологической науке – цитоскелет и внутриклеточный транспорт. Нет сомнений, что эта

область исследований будет и дальше динамично развиваться, в том числе, и в плане математического моделирования транспортных процессов.

Автором получены оригинальные и достоверные результаты, они доложены на международных и российских конференциях и опубликованы в рецензируемых российских и международных журналах. В изданиях *Current Biology* и *Molecular Biology of the Cell* иллюстрации, полученные с участием автора, вынесены на обложку журналов, что дополнительно свидетельствует о высоком качестве и наглядности полученных результатов. Выводы корректно отражают полученные диссертантом результаты. Содержание автореферата соответствует содержанию диссертации.

Таким образом, диссертация Антона Владимировича Буракова «Цитоскелет как система путей внутриклеточного транспорта в клетках животных» является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как научные достижения в области биологической подвижности, что полностью соответствует п.9 Положения о порядке присуждения учёных степеней, утверждённого постановлением правительства РФ от 24 сентября 2013г. № 842, а диссертант заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Директор института экспериментальной кардиологии
Российского Кардиологического
Научно-производственного Комплекса
Министерства здравоохранения Российской Федерации
заведующий лабораторией клеточной подвижности
доктор биологических наук, профессор

25.04.2014



В.П. Ширинский

ОТЗЫВ

на автореферат диссертационной работы

Буракова Антона Владимировича «Цитоскелет как система путей внутриклеточного транспорта в клетках животных»,

представленной на соискание ученой степени

доктора биологических наук по специальности 03.03.04

«Клеточная биология, цитология, гистология».

Диссертационная работа А.В. Буракова, автореферат которой представлен на отзыв, является логическим обобщением цикла экспериментальных работ автора, посвященных крайне актуальной теме, много лет находящейся в центре внимания клеточных биологов - исследованию функциональной активности цитоскелета животной клетки и выяснению его роли в организации внутриклеточного транспорта. Выбранная для исследования тема является крайне современной. Ее актуальность обусловлена тем, что целый ряд фундаментальных вопросов организации внутриклеточного транспорта, не имевших ответа несмотря на крайне интенсивное исследование, не позволял суммировать все известные факты и выстроить единую логичную и непротиворечивую схему того, как клетка осуществляет транспортные процессы.

Несмотря на длительную историю изучения и множество опубликованных другими исследователями работ, автор внес существенный вклад в развитие теоретических представлений об организации внутриклеточного транспорта, в том числе описал механизмы, определяющие архитектуру тубулиновой транспортной системы, а также однонаправленность транспорта по актиновой транспортной сети.

В своих исследованиях, представленных в диссертационной работе, А.В. Бураков впервые описал (1) совокупность механизмов позиционирования centrosомы в интерфазной клетке животных; (2) продемонстрировал участие двух белков – динеина и киназы LOSK - в процессе закоривания микротрубочек на centrosоме (причем в обоих случаях данные прижизненных экспериментов *in vivo* полностью подтверждались экспериментами *in vitro*). Автором была выявлена ранее не описанная роль моторного белка динеина как структурно-образующего элемента цитоскелета. В целом, полученные в представленной работе результаты впервые позволяют объяснить центральное расположение centrosомы в клетках животных.

В своем исследовании А.В. Бураков использовал широкий набор самых современных методов молекулярной биологии и микроскопии, в том числе и ряд оригинальных методов, разработанных специально для решения поставленных в диссертации задач – фазово-контрастную микроскопию с компьютерным усилением, иммунофлуоресцентную

микроскопию, прижизненную флуоресцентную видеомикроскопию, электронную микроскопию, метод FRAP (метод восстановления флуоресценции после обесцвечивания), а также системы изучения подвижности *in vitro*. Использование столь комплексного подхода автор сочетал с компьютерным моделированием.

Такой комбинированный подход и аккуратность в интерпретации полученных данных позволили автору провести уникальные исследования динамики компонентов цитоскелета. Разработанный автором (и уже вошедший в учебники) оригинальный метод локального разрушения системы микротрубочек в сочетании с методами прижизненной флуоресцентной видеомикроскопии и воздействиями различных ингибиторов позволил получить новые данные, которые легли в основу компьютерной модели, описывающей все аспекты процесса центрирования. Таким образом, оригинальные исследования А.В. Буракова внесли весомый вклад в понимание фундаментальных основ организации внутриклеточного транспорта - этот процесс автором был исследован полностью: выявлены силы, воздействующие на микротрубочки, описаны его регуляторы и определен относительный вклад каждого из участвующих структурных элементов.

Помимо того, что представленная работа значительно расширяет теоретические представления о пространственной организации внутриклеточного транспорта, она открывает перспективы для биомедицинских исследований. В частности, работа предлагает подходы для разработки фармакологических агентов, влияющих на внутриклеточный транспорт патогенных частиц, вызывающих инфекционные заболевания.

Отдельно следует отметить тщательность, с которой оформлен автореферат - в нем присутствуют рисунки исключительно отличного качества, полностью иллюстрирующие полученные автором результаты и позволяющие делать выводы о сложности и фундаментальности работе в целом.

По научно-методическому уровню диссертационная работа А.В. Буракова отвечает всем требованиям, предъявляемым к современным исследованиям в области клеточной биологии. Результаты достоверны, а выводы обоснованы. Материалы диссертации регулярно докладывались на всероссийских съездах и конгрессах, а также международных конференциях и симпозиумах; результаты работы полностью отражены в статьях, на протяжении ряда лет публиковавшихся автором в ведущих отечественных журналах, соответствующих тематике представленного исследования, и в зарубежных журналах с высоким импакт-фактором.

На основании вышеизложенного считаю, что работа А.В. Буракова «Цитоскелет как система путей внутриклеточного транспорта в клетках животных» представляет собой законченный труд, открывающий перспективы для дальнейшего исследования цитоскелета клетки и механизмов внутриклеточного транспорта для целей молекулярной диагностики и

медицины. По своей актуальности, научной новизне и практической значимости полученных результатов, работа полностью соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени.

Ведущий научный сотрудник
НИИ ФХБ им. А.Н.Белозерского, МГУ
доктор биологических наук,

Алиева И.Б.

25.04.2014



ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Буракова Антона Владимировича «Цитоскелет как система путей внутриклеточного транспорта в клетках животных», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.04 — клеточная биология, цитология и гистология

Диссертационная работа А.В.Буракова посвящена исследованию механизмов внутриклеточного транспорта, опосредованных тубулиновым и актиновым цитоскелетом. Многие важные аспекты этого процесса, в частности, направленность транспорта, тесно связаны с архитектурой системы микротрубочек и микрофиламентов, поэтому значительная часть усилий диссертанта была направлена на исследование механизмов позиционирования центров организации микротрубочек и роли моторных белков и регуляторных компонентов (протеинкиназы LOSK) в этом процессе. Было показано, что центральное расположение центриоли как главного клеточного центра организации микротрубочек определяется тянущим усилием динеинов и центростремительным током актина. Отдельно были рассмотрены механизмы миозин-зависимого транспорта органелл по микрофиламентам. В результате было показано, что более важным для обеспечения однонаправленного транспорта по микрофиламентам является не активность моторных белков, а динамические свойства самих микрофиламентов, формирующих актиновый цитоскелет. Данные положения были экспериментально обоснованы в серии аккуратных и элегантных экспериментов с привлечением широкого арсенала современных методов клеточной и молекулярной биологии. В работе А.В.Буракова использовались разнообразные модельные системы, позволившие эффективно реализовать намеченный план исследований и получить важные, интересные, однозначные и статистически достоверные результаты. Считаю, что диссертационная работа А.В.Буракова отвечает требованиям, указанным в Положении о присуждении ученых степеней (Постановление правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842), в ней содержится решение задачи, имеющей большое значение для развития клеточной биологии, а ее автор Бураков Антон Владимирович, заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.04 — «клеточная биология, цитология и гистология»

Киреев И.И. д.б.н.

Зав. Отделом электронной микроскопии

НИИ физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского

МГУ имени М.В.Ломоносова

05.05.14.
Подпись уполномоченного
Зам. директора



Д. А. Шамбеев

ОТЗЫВ

на автореферат диссертационной работы Буракова Антона Владимировича
«Цитоскелет как система путей внутриклеточного транспорта в клетках
животных», представленной на соискание учёной степени
доктора биологических наук по специальности 03.03.04
«Клеточная биология, цитология, гистология»

Диссертация А.В. Буракова посвящена изучению пространственной организации и функциональной активности цитоскелета, по которому происходит перемещение молекулярных моторов и транспорт по клетке различных органелл. Актуальность темы исследования обусловлена важностью процессов, для которых необходим внутриклеточный транспорт. Это эндоцитоз, направленная подвижность клеток, рост сосудов, осуществление иммунного ответа и др. За последние годы было опубликовано множество работ, посвящённых внутриклеточному транспорту, несмотря на это, автору удалось внести существенный вклад в развитие фундаментальных представлений о его организации.

Известно, что в клетках существуют две транспортные системы: тубулиновая, в которой перемещение грузов происходит вдоль микротрубочек; и актиновая, в которой транспорт органелл осуществляется по актиновым филаментам. При этом тубулиновая транспортная система обладает упорядоченной архитектурой, и транспорт по микротрубочкам идёт в двух направлениях. Актиновые микрофиламенты расположены беспорядочно, и транспорт по ним в клетках направлен в одну сторону. Диссертационная работа А.В. Буракова состоит из трёх частей, в которых последовательно рассматриваются следующие вопросы: 1. Какие силы определяют центральную симметричность системы микротрубочек? 2. Каковы молекулярные механизмы удержания минус-концов микротрубочек на центросоме? 3. Какую роль играет динамика актиновых филаментов в миозин-зависимом транспорте органелл?

В результате проведённых исследований автором был раскрыт ряд механизмов, определяющих архитектуру системы микротрубочек как основной транспортной системы клетки. В частности, были впервые описаны механизмы позиционирования центросомы в интерфазных клетках и впервые показано участие в процессе удержания микротрубочек на центросоме киназы LOSK и моторного белка динеина. Кроме того, впервые было продемонстрировано, что миозин-зависимый транспорт зависит от динамики актиновых филаментов.

Автор проделал большой объем экспериментальной работы с использованием самых современных методов молекулярной и клеточной биологии. В частности, были

использованы методы молекулярного клонирования, получения так называемых «клеточных теней», иммунофлуоресцентной и прижизненной флуоресцентной микроскопии, микроинъекций ДНК, флуоресцентных белков и различных ингибиторов, и пр. Кроме того, автором был разработан оригинальный метод локального разрушения цитоскелета, который позволил детально исследовать баланс сил, приложенных к центросоме со стороны микротрубочек. Полученные экспериментальные данные были использованы для построения компьютерной модели.

В результате проделанной работы автором были сформулированы положения, существенно расширяющие имевшиеся представления о пространственной организации внутриклеточного транспорта. Полученные результаты имеют не только фундаментальное, но и научно-практическое значение, поскольку разработка фармакологических агентов, влияющих на внутриклеточный транспорт патогенных частиц, является одной из задач современной молекулярной медицины.

Полученные А.В. Бураковым результаты не вызывают сомнений, его выводы обоснованы. Точная формулировка целей и задач исследования, тщательное планирование экспериментов и продуманность контрольных опытов позволили получить новые и достоверные научные результаты. Материалы диссертации докладывались на различных всероссийских и международных конференциях и симпозиумах. Результаты работы полностью отражены в статьях, опубликованных в высокорейтинговых зарубежных журналах и ведущих отечественных журналах, соответствующих тематике исследования.

Хороший литературный стиль написания автореферата, а также тщательно подобранные цветные иллюстрации делают понятным описание большого объема экспериментальной работы, проведенной автором.

Таким образом, работа А.В. Буракова «Цитоскелет как система путей внутриклеточного транспорта в клетках животных» представляет собой законченный труд, по своей новизне, актуальности и практической значимости соответствующий требованиям, предъявляемым к докторским диссертациям, а А.В. Бураков заслуживает присуждения ему ученой степени доктора биологических наук.

Доцент кафедры клеточной биологии и гистологии

биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

кандидат биологических наук



ПОДПИСЬ РУКИ
ЗАВЕРЯЮ

Доцентом биологического факультета МГУ

Липина Т.В.

30.04.2014.

ОТЗЫВ

на автореферат диссертационной работы Антона Владимировича Буракова «Цитоскелет как система путей внутриклеточного транспорта в клетках животных» на соискание ученой степени доктора биологических наук

Диссертационная работа «Цитоскелет как система путей внутриклеточного транспорта в клетках животных», представленная А. В. Бураковым на соискание ученой степени доктора биологических наук, является масштабным исследованием, выполненным в области клеточной биологии. Работа состоит из 3 частей, посвященных разным аспектам внутриклеточного транспорта. Первая и вторая части описывают исследования механизмов, ответственных за локализацию центросомы в клетках и формирование радиальной системы микротрубочек. Приведенные автором результаты демонстрируют, что система микротрубочек является результатом координированного действия многих факторов: полимерного тубулина, ассоциированных моторных белков и некоторых регуляторных белков. Третья часть посвящена изучению роли миозинового транспорта органелл вдоль актиновых микрофиламентов. Показано, что в функционировании актомиозиновой системы транспорта важную роль играет динамика микрофиламентов. Работа выполнена на самом современном уровне и опубликована в ведущих отечественных и международных журналах. Давая высокую оценку работе А. В. Буракова в целом, необходимо отметить и некоторые недостатки, обнаруживаемые при чтении автореферата. 1) Поскольку радиальная система микротрубочек имеется далеко не во всех типах клеток с активным внутриклеточным транспортом, автору следовало бы более осторожно формулировать задачи исследования и выводы работы. 2) Неудачной представляется формулировка в первом выводе «сбалансированный механизм обратной связи с участием трех сил». 3) Во втором выводе не понятно утверждение о том, что «сила динеина, приложенная вдоль микротрубочек пропорционально их длине». 4) В шестом выводе имеется явное противоречие между двумя частями одного предложения. 5) Седьмой вывод противоречит общеизвестному факту, что миозин VI транспортирует грузы в направлении минус конца актиновых микрофиламентов.

Работа А. В. Буракова полностью отвечает требованиям, предъявляемым к докторским диссертациям, а автор заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук.

Зав. отделом Клеточной биологии
Института белка РАН
кандидат биологических наук



А. А. Минин

ОТЗЫВ

**на автореферат диссертации Антона Владимировича Буракова
"Цитоскелет как система путей внутриклеточного транспорта в клетках
животных",**

представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Диссертационная работа А.В. Буракова посвящена изучению структурной организации внутриклеточного транспорта. В ней автор представляет концепцию, которая описывает архитектуру и механизм работы тубулиновой транспортной системы. Автор также объясняет, от чего зависит направление движения органелл по сети актиновых филаментов. Актуальность данного исследования определяется ключевой ролью цитоскелета и внутриклеточного транспорта во многих процессах, в частности, поляризации и направленного перемещения клеток, необходимых для протекания эмбриогенеза, осуществления ангиогенеза, развития воспалительных процессов и пр. Кроме того, перемещение по цитоплазме различных патогенов может определять инфекционность того или иного возбудителя заболеваний. Таким образом, тема данной работы имеет не только фундаментальное, но и научно-практическое значение.

Автореферат диссертации снабжён иллюстративным материалом, позволяющим получить полное представление о поставленных экспериментах и полученных результатах. Автору удалось впервые описать совокупность механизмов позиционирования centrosом в интерфазных клетках; продемонстрировать участие белков LOSK и динеина в процессе заякоривания микротрубочек на centrosоме; и показать, что миозин-зависимый транспорт органелл зависит от динамики актиновых филаментов. На основании полученных данных автором была предложена новая динамическая модель структурной организации тубулинового цитоскелета. В ходе выполнения работы А.В. Бураковым был использован широкий арсенал самых современных методов клеточной и молекулярной биологии; кроме того, им был разработан и применён новый метод локального разрушения системы микротрубочек путём локального воздействия ингибитора на участок клетки.

Результаты работы были представлены на многих отечественных и зарубежных конференциях; по результатам работы был опубликован ряд статей в высокорейтинговых научных журналах, как отечественных, так и зарубежных.

Подробное описание методик, использованных в поставленных автором экспериментах, позволяет говорить о том, что полученные им результаты достоверны, а выводы обоснованны.

На основании вышеизложенного мы считаем, что работа А.В. Буракова «Цитоскелет как система путей внутриклеточного транспорта в клетках животных» полностью отвечает требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени доктора биологических наук, а её автор заслуживает присуждения искомой степени.

29 апреля 2014 г.

Декан Факультета фундаментальной
медицины МГУ имени М.В. Ломоносова,
академик РАН, профессор,

В.А. Ткачук

Ведущий научный сотрудник
Факультета фундаментальной медицины
МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. биол. наук,

А.В. Воротников

Заверяю: *подпись Воротникова А.В.*
Специалист ОК *Жежнова И.А.*

